

551156

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087919 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/10,
C12Q 1/68, G01N 33/543, 37/00, 21/64

江東区青海 2-4 1-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004102

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-089494 2003 年 3 月 28 日 (28.03.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 旭井 亮一 (ASAI, Ryoichi) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海 2-4 1-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 西村 信一郎 (NISHIMURA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海 2-4 1-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 高橋 勝利 (TAKAHASHI, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒1350064 東京都

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF OBTAINING APTAMER WITH THE USE OF MICROARRAY

(54) 発明の名称: マイクロアレイを用いたアプタマーの取得方法

(57) Abstract: A polynucleotide can be easily loaded on a chip and a polynucleotide (an aptamer) capable of binding to a target molecule can be instantaneously assayed by using a microarray which is originally developed in order to analyze the expression of RNA occurring in a cell. Namely, it is found out that an aptamer capable of binding to a target molecule can be quickly and efficiently obtained by using a microarray.

(57) 要約: 本来は細胞内に存在する RNA の発現解析のために開発されたマイクロアレイを用いることにより、ポリヌクレオチドを簡単にチップ上にのせることができ、かつ、標的分子と結合し得るポリヌクレオチド (アプタマー) を瞬時に測定することができる。即ち、マイクロアレイを用いることにより標的分子と結合するアプタマーを迅速かつ効率的に取得できることが見出された。

WO 2004/087919 A1

- 1 -

明細書

マイクロアレイを用いたアプタマーの取得方法

5 技術分野

本発明は、生物工学の分野、より詳しくは生体高分子の取得方法に属する。

背景技術

DNA、RNA は生物においては、主に遺伝情報を担う分子である。しかし、一本鎖
10 DNA 及び RNA には標的分子と特異的に結合する塩基配列を持つものがある。これ
をアプタマーという。アプタマーは主に SELEX 法（非特許文献 1 および非特許文
献 2 参照）によって取得されている。これは特定の長さの塩基配列をもつ DNA も
しくは RNA をランダムに生成し、標的分子と結合する DNA もしくは RNA のふるい
わけを行うことにより、アプタマーとしての機能を持つ DNA もしくは RNA を探索
15 する方法である。この方法においては、すべての配列集団が同じ溶液中に溶解し
ているため、最終的にはシーケンサーによって配列を特定しなければならない。
これとは別に、配列別に測定を行うことにより、機能的ポリヌクレオチド（また
はポリペプチド）を検索する方法が考えられた。これらの方法においては、アミ
ノ酸配列を個別に測定し、相対的に高い活性を持つ配列から遺伝的アルゴリズム
20 もしくはエクソンシャフリングによって新しい配列を作り、それらをさらに個別
に測定し、これを何度も繰り返すことによって高い活性を持つ配列を検索する方
法を考えた（特許文献 1 および非特許文献 3 参照）。

SELEX による方法は、非常に大きな配列集団を扱うことができるが、全ての配
列が同一の溶液に溶解しているので、配列を決定するのに時間とエネルギー及び
25 コストが必要である。それに対し横林らの方法は個別に測定するので初めから配
列が決定しているが、配列集団を大きくすると、配列の合成や測定に時間とエネ

- 2 -

ルギー及びコストが必要である。

これまでに、ディファレンシャル・ディスプレイ法のためのプライマー選択方法（特許文献2参照）、あるいは、アプタマーを備えたバイオセンサー（特許文献3参照）等については、既に知られているものの、短時間・低コストかつ効率的にアプタマーを選択可能な方法は、これまでのところ知られていなかった。

5 [特許文献1]

国際公開第99/11818パンフレット

[特許文献2]

特開2000-30848.7号公報

10 [特許文献3]

特開2002-207026号公報

[非特許文献1]

Ellington, A. D., および Szostak, J. W. 著、Nature、Vol. 346、p. 818-822、1990年

15 [非特許文献2]

Tuer K. C. および Gold, L. 著、Science、Vol. 249、p. 505-510、1990年

[非特許文献3]

Yokobayashi, Y. 著、J. Chem. Soc., Perkin Trans. Vol. 1、p. 2435-2437、1996年

20

発明の開示

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は従来の方法よりも効率的にアプタマーを取得する方法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。従来の横林らの方法
25 方法は、配列の数が多くなればなるほど、配列の作成および測定に要する時間が増えるため、多くの配列を処理することができない。そこで本発明者らはマイク

- 3 -

ロアレイを利用することにより、その手間を短縮することに成功した。マイクロアレイにおいては指定した配列を自動的に指定したチップ上の位置に合成することが可能であり、大きなもので数千配列を配置することができる。これら DNA マイクロアレイには大きく分けて 2 種類が存在する。ひとつは PCR を行った増幅産物本体をチップ上にのせるものであり、もうひとつはチップ上にオリゴヌクレオチドを順次合成しておおよそ 30 塩基をチップ上にのせることができる。本来は細胞内に存在する RNA の発現解析のために開発されたが、後者のマイクロアレイを用いることにより、一塩基あるいは二塩基置換のオリゴヌクレオチドを簡単にチップ上にのせることができるため、このシステムをアプタマーの検索にも利用できることに着目した。そして、同時に多くのアプタマーの性能を、蛍光標識と専用のスキャナーを利用することにより、瞬時に測定することが可能である。本発明者らは、マイクロアレイを用いることにより標的分子と結合するアプタマーを迅速かつ効率的に取得できることを初めて見出した。

すなわち本発明は、マイクロアレイを用いたアプタマーの取得方法に関し、より具体的には、

- [1] アプタマーの取得方法であって、以下の工程 (a) ~ (e) を含み、工程 (b) ~ (e) を任意の回数繰り返すことを特徴とする方法、
 - (a) 互いに異なる塩基配列からなる複数のポリヌクレオチドをマイクロアレイ用基板上へ固定する工程、
 - (b) 標識された標的分子とポリヌクレオチドが結合したマイクロアレイ用基板とを接触させる工程、
 - (c) 前記標的分子の前記ポリヌクレオチドとの結合強度を測定する工程、
 - (d) 結合強度の高いポリヌクレオチドを 1 つもしくは複数個選択する工程、
 - (e) 工程 (d) によって選択された各々のポリヌクレオチドの塩基配列において、変異が導入された塩基配列からなるポリヌクレオチドを、それぞれマイクロアレイ用基板上へ固定する工程、

- 4 -

〔2〕工程（e）の変異が、1または2塩基の置換変異である、〔1〕に記載の方法、

〔3〕標識が蛍光標識である、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔4〕標的分子を溶解した溶液にマイクロアレイ用基板を浸すことによって、工程

5 （b）の接触を行う、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法、

〔5〕工程（a）のポリヌクレオチドが、コンピュータによって作成されるランダムな配列であることを特徴とする、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法、
を提供するものである。

10 本発明は、マイクロアレイを用いることを特徴とするアプタマーの取得方法に関する。

本方法の好ましい態様においては、標的分子と結合し得るアプタマーを、マイクロアレイ上の既定の位置におけるシグナル強度を指標として取得する方法である。即ち本発明は、マイクロアレイ用基板（本明細書においては、単に「基板」と記載する場合あり）に固定されたアプタマーの候補となる被検ポリヌクレオチドと、標的分子との結合活性を指標として、標的分子と結合し得るアプタマーを
15 取得する方法である。

本発明においてアプタマーとは、標的分子と結合し得る核酸分子（例えば、ポリヌクレオチド）を言う。例えば、図1のようにアプタマーを模式的に示すことができる。通常、塩基配列の種類や、長さを変えることにより、種々な標的分子
20 を結合させることができる。また、本発明における「ポリヌクレオチド」には、所謂「オリゴヌクレオチド」も含まれる。

マイクロアレイとは、一般的に、基板上にポリヌクレオチド等を整列（アレイ）固定化させたデバイスを言い、通常、ガラス、シリコン等の基板表面にヌクレオチドを載せたものを指す。基板上へ一度に複数種のポリヌクレオチドを合成
25 させることで作製された高密度アレイは、DNAチップとも呼ばれるが、本発明のマイクロアレイは、所謂「貼り付け型」マイクロアレイに限定されず、基板上で

オリゴヌクレオチドが合成される所謂「チップ」もまた本発明のマイクロアレイに含まれる。

本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般にマイクロアレイ技術で使用される基板（例えば、ガラス、シリコン製）を好適に用いることができる。

一般にマイクロアレイは、高密度に基板上へスポット（基板へのポリヌクレオチドの固定の工程は、「プリント」とも呼ばれる。）された何千ものポリヌクレオチドで構成されている。通常これらのヌクレオチドは非透過性(non- porous)の基板の表層にスポット（プリント）される。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することも可能である。ポリヌクレオチドのアレイにおいて、ポリヌクレオチドはインサイチュ(*in situ*)で合成することができる。例えば、photolithographic の技術(Affymetrix 社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics 社)技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。本発明における基板上への「固定」とは、所謂「合成」の意味も含まれる。当業者においては、通常、高密度スポット（プリント）を可能にした市販の装置を用いて、例えば、スライドガラス上の1万種類以上のスポット（プリント）を含むマイクロアレイを実験室において適宜作製することができる。

本発明においては、ポリヌクレオチドを人工的に合成した後、基板上へ固定することも可能であり、その際、ポリヌクレオチドの合成も、当技術分野においては既知の標準的な方法によって、例えば、市販の自動 DNA 合成機を使用して実施することが可能である。

本発明のアプタマー取得方法の好ましい態様においては、下記の工程 (a) ~ (e) を含む方法である。

- 6 -

- (a) 互いに異なる塩基配列からなる複数のポリヌクレオチドをマイクロアレイ用基板上へ固定する工程
- (b) 標識された標的分子とポリヌクレオチドが結合したマイクロアレイ用基板とを接触させる工程
- 5 (c) 前記標的分子の前記ポリヌクレオチドとの結合強度を測定する工程
- (d) 結合強度の高いポリヌクレオチドを1つもしくは複数個選択する工程
- (e) 工程(d)によって選択された各々のポリヌクレオチドの塩基配列において、変異が導入された塩基配列からなるポリヌクレオチドを、それぞれマイクロアレイ用基板上へ固定する工程
- 10 本発明における標的分子としては、特に制限はないが、例えば、天然化合物、合成化合物、ペプチド、非ペプチド性化合物等を挙げることができる。また、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製蛋白質、もしくはこれらから単離精製される分子を標的分子とすることができる。より具体的には、標的分子として、例えばセンサーの素子として応用できる物質、あるいは、疾患のバイオマーカー等を挙げることができる。
- 15 センサーの素子としては、水質汚染物質であるシアノバクテリア等が放出する肝臓毒ミクロシスチンや、癌の指標物質である α フェトプロテイン等を例示することができる。

- 本発明の標的分子は蛍光標識されている、もしくは標的分子自体が蛍光標識されたものであることが好ましい。
- 20

- 標的分子の蛍光標識は、当業者においては、標的分子の種類を考慮して公知の方法によって、適宜実施することができる。例えば、標的分子がタンパク質である場合には、例えば、アミノ基を標識する方法と、スルフヒドリル基(-SH)を標識する方法等によって、標的分子を好適に蛍光標識することができる。これらの
- 25 方法においては、通常、タンパク質・ペプチド・免疫抗体の配列中やN末端に、リジン残基のアミノ基、またはシステイン残基のスルフヒドリル基を有すること

- 7 -

から、これらを介して蛍光物質を標的分子に結合させることができる。

通常、標的分子の蛍光標識には、分離識別が可能な波長の光を吸収、放出する
蛍光標識物質が用いられる。異なる色の複数の蛍光色素を本発明のマイクロアレ
イにおいて使用することにより、1回のアッセイで2つ以上の標的分子について
5 のアプタマーの検索を行うことも可能である。

また本発明における標識は、蛍光物質以外の物質、例えば、発光(chemiluminescence)物質あるいは電気活性物質等を用いて行うことも可能である。

本発明において基板に固定するポリヌクレオチドは、その配列の種類は特に制限されず、通常、ランダムな配列からなる。「ランダムな配列」は、当業者にお
10 いては、適宜、コンピュータ（計算機）を利用することにより得ることができる。
多くのアプタマーは、ステム構造を有することから、本発明の上記ポリヌクレオチドの一つの態様として、両末端のそれぞれの数塩基が互いに相補的な配列となるよう（ステムを形成し得るよう）に設計することもできるが、必ずしもこのように設計する必要はない。

15 基板に固定されるポリヌクレオチドの長さは、特に制限されるものではないが、通常10～100ベースであり、好ましくは20～80ベースであり、さらに好ましくは50～80ベースである。アプタマーにおける標的分子を認識する部位は通常30ベース程度である、との報告が多いことから、本発明のポリヌクレオチドは、30ベース以上であることが好ましい。

20 また本発明において基板に固定されるポリヌクレオチドは、通常、複数であり、その配列は互いに異なることが好ましい。しかし、上記ランダムな配列を複数得た結果、偶然、同一の配列を取得することもあるため、本発明において基板に固定されるポリヌクレオチドは、その配列が必ずしも、互いに異なる場合に限定されない。基板へ固定されるポリヌクレオチドの種類数には特に制限はない
25 が、通常、数百～数万種類である。本発明においては、基板上へ固定される被検ポリヌクレオチドの種類数を増加させることにより、効率的に所望のアプタマー

の取得を行うことができる。

本発明のマイクロアレイ基板には、対照として、予め、標的分子に対してアプタマーであることが判明している（陽性対照）、またはアプタマーでないことが判明している（陰性対照）ポリヌクレオチドを固定しておくことも可能である。

- 5 これらの対照は、標的分子に対して結合強度の高いポリヌクレオチドの選択の際、あるいは、被検ポリヌクレオチドがアプタマーであるか否かの判定の際に有用である。

- 10 本発明において当業者は、マイクロアレイ装置として、市販の装置を使用することができる。例えば、コンビマトリクスコーポレーション (CombiMatrix Corporation) によって開発され、ロシュディアグノスティックス社 (Roche Diagnostics) によって販売されている。

本発明の上記工程 (b) における「接触」は、特に限定されるものではないが、例えば、以下の条件にて行うことができる。

- 15 レゾルフィン (resorufin) ($E_x=571\text{ nm}$, $E_m=585\text{ nm}$) を含む 3 x SSPE (20 x SSPE: 0.2 M リン酸 (phosphate), pH 7.4 (± 0.1 , 25°C), 2.98 M 塩化ナトリウム (sodium chloride), 0.02 M EDTA) に本発明の基板を浸し、常温 25°C で 16 時間インキュベートする。

- 20 本発明においては、次いで、上記「接触」の際に使用した反応溶媒と同一の溶媒で洗浄を行うことが好ましい。この洗浄の際に使用する溶媒は、好ましくは、(蛍光) 標識物質を含まない。また、この洗浄の工程は、通常、2 ~ 3 回程度行うことが好ましい。洗浄することにより、ポリヌクレオチドと結合しない標的分子を除去することができる。さらに、本発明の好ましい態様においては、次いで、基板を乾燥させる。この乾燥は、例えば、洗浄後遮光した乾燥機に入れて 1 時間程度乾燥させることにより行うことができる。

- 25 本発明の好ましい態様においては、標識された標的分子と、基板に固定されたポリペプチドとの結合強度を測定する。標的分子と結合しないポリヌクレオチド

は、マイクロアレイ基板上のその位置において蛍光等のシグナルは產生されない。

標識が蛍光標識である場合、通常、結合強度が大きいものほど、蛍光強度（蛍光の明るさ）も大きくなる。マイクロアレイ上での蛍光シグナルは、一般的に、蛍光検出器を用いて検出する。この検出には、通常、公知の機材、例えば、共焦点
5 スキャンニング装置またはCCD (Charge Coupled Device) カメラを用いて行うことができる。共焦点スキャナーでは、通常、基板あるいは共焦点レンズを二次元的に動かしながら、基板上の微小領域にレーザー光を照射し、蛍光分子を励起する。基板上の各位置の蛍光サンプルから放出された光は、光電子増倍管 (Photo Multiplier Tube) 等の検出器によって電気信号データに変換され、共焦点スキャナ
10 ーによってデータが収集される。CCDカメラを用いた場合も、共焦点スキャナーと同様の原理によって検出が行われる。蛍光検出器としては、例えば、以下のような市販の機器を示すことができる。

- ・スキャン型：Scan Array 4000, 5000 (General Scanning 社)、GMS418 Array Scanner (宝酒造) 等

- 15 ・CCDカメラ型：Gene Tac 2000 (Genomic Solutions 社) 等

一般に、上記のようにしてマイクロアレイから得られるデータは、膨大なものとなるため、該データと基板へ固定されたポリヌクレオチドの位置との対応の管理や、データ解析は、データ解析用ソフトウェアがインストールされたコンピュータを利用して行われる。

20 また、蛍光標識以外の方法によって標識された場合には、標識方法を適宜考慮して、例えば、発光(chemiluminescence)や電気化学的(electrochemistry)に結合強度を測定することができる。

本発明の上記工程 (d) においては、好ましくは、最大の結合強度を示す一つのオリゴヌクレオチドを選択するが、必ずしも、選択されるオリゴヌクレオチド
25 の数は、一つに限定されず、高い結合強度を示す複数のオリゴヌクレオチドを選択してもよい（選択されたオリゴヌクレオチドの配列を「親配列」と記載する場

- 10 -

合あり)。一例を示せば、被検オリゴヌクレオチドについて結合強度の高い上位 10 個、もしくは上位 1%を選択して親配列とすることができる。

本発明においては、次いで、上記工程 (d) によって選択されたオリゴヌクレオチドを親配列として、該配列に変異を導入した配列 (子孫配列) を作成する。

- 5 上記の変異は、その種類、数について特に制限されるものではないが、好ましくは、1~10 塩基の置換変異であり、より好ましくは、1 もしくは 2 塩基の置換変異である。一つのポリヌクレオチドの複数の塩基に対して置換変異を導入する場合には、特に限定されるものではないが、好ましくは、連続する複数の塩基に対する置換変異であり、より好ましくは、隣合う 2 塩基を置換する変異である。また、
10 本発明における上記変異の種類は、特に「置換変異」に限定されるものではなく、その他の変異、例えば、「挿入変異」、「欠失変異」であつてもよい。また、親配列が複数の場合には、これら配列の一部を交叉させることにより、子孫配列を取得することも可能である。

上記の「子孫配列」は、適宜コンピュータを利用して作成することができる。

- 15 作成する子孫配列の種類は、特に制限されない。一般的に、作成する子孫配列の種類は、できるだけ多いことが好ましい。

本発明においては、次いで、上記工程 (d) によって変異が導入された配列からなるポリヌクレオチド (子孫配列) を、マイクロアレイ用基板上へ固定する。

- 20 上記変異が導入されたポリヌクレオチドを基板上へ固定する方法は、上述の方法によって行うことができる。

本発明の好ましい態様においては、上記工程 (e) に次いで、上記工程 (b) ~ (e) を任意の回数繰り返すことを特徴とする方法である。

- 25 上記工程を繰り返すことにより、標的分子との結合強度がより高いオリゴヌクレオチドを取得することができる。最終的に取得されるオリゴヌクレオチドは、標的分子との結合活性が高く、即ち、アプタマーであるものと考えられる。

上記の「繰り返す」回数は、通常、5~6 回程度であるが、アプタマーを取得

- 11 -

可能な回数であれば特に制限されない。一般的に、繰り返しの回数はできるだけ多いほうが良い。アプタマーであることが判明しているポリヌクレオチドを対照として本発明の基板上へ固定する場合には、例えば、該ポリヌクレオチドと標的分子との結合強度と同等の結合強度になるまで、繰り返すことが好ましい。

- 5 また、本発明においては、被検ポリヌクレオチドに代えて、ポリペプチドを用いることも可能である。当業者においては、ポリペプチドを基板上へ固定することは可能である。

図面の簡単な説明

- 10 図 1 は、標的分子と結合するアプタマーを模式的に示す図である。中央の黒い円が標的分子を表す。アプタマーの配列を、配列番号：1 に例示する。

図 2 は、本発明の一つの態様におけるルーチンワークを示す図である。

図 3 は、DNA チップの蛍光を示す写真である。各スポットに指定した DNA 配列を合成したチップ。A は第 0 世代のチップでランダムな配列が配置されている。

- 15 最も明るいスポットマザー (Mother) から、子孫配列を作り、B の第 1 世代のチップを作った。第 0 世代より、多くのスポットが蛍光している。さらにこの中で最も明るい配列チャイルド (Child) から C の第 2 世代のチップを作った。チャイルドより明るい配列はこのチップ上にはなかったが、第 1 世代のチップより多くのスポットが蛍光していることがわかった。

- 20 図 4 は、最終的に得られた配列の二次構造を mfold にて予測した結果を示す図である。二次構造の配列を、配列番号：2 に例示する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施

- 25 例に制限されるものではない。

〔実施例〕 蛍光色素レゾルフィンに対するアプタマーの検索

- 12 -

蛍光色素レゾルフィン(Resorufin)に結合するポリヌクレオチド(アプタマー)の検索を行った。まず、塩基数 20 のポリヌクレオチド配列をランダムに生成した。但し、5' 末端側の 5 塩基をすべて C とし、3' 末端側の 5 塩基をすべて G とし、C-G 結合によるステム(stem; 茎)を持つようにした。残りの 10 塩基はランダムに選択し、異なる 300 配列をコンピュータ(計算機)によって生成した。この配列を COMBIMATRIX 社製の DNA シンセサイザーに専用のチップをセットし、チップ上の各スポットに指定した塩基配列を合成させた。合成終了後、チップを、レゾルフィンを溶解させた溶液に一定時間浸し、その後取り出して、レゾルフィンを含まない溶媒で 2 度洗浄して乾燥させた。このチップを ArrayWoRx 社製のスキヤナーにて蛍光を撮影し、その強度を測定した。最大の強度を持つ配列を決定した。それを親配列とし、以下の方法で子孫配列をコンピュータ(計算機)内に作成した。

- (a) 一塩基置換。20 塩基のうち、1 塩基だけ違う塩基に置換する。
- (b) 二塩基置換。20 塩基のうち、2 塩基を置換する。ただし、隣合う 2 塩基のみを置換する。

(a), (b) の方法で作成した子孫配列データを再び DNA シンセサイザーに供し、DNA チップを作成してスキヤナーにかけて、最大の強度を持つ配列を決定した。この過程を数回繰り返した後、強い強度をもつポリヌクレオチド、即ちアプタマーを取得した。

産業上の利用の可能性

本発明により、マイクロアレイを用いたアプタマーの取得方法が提供された。本発明は、(1) PCR を使う必要がない、(2) オンチップでの結合試験でアフィニティーの高さを調べることができるので簡単である、(3) SELEX 法よりも数学的に絞り込むことができる、(4) DNA シークエンサーで読み取る必要がない、等の利点を有する。また、本発明の方法によって、専門的知識がなくても、D

- 13 -

NA シンセサイザーとスキャナーがあれば、アプタマーの取得が可能である。将来
ブランクチップの値段が低下すれば、非常に低いコストでアプタマーを検索する
ことができる。

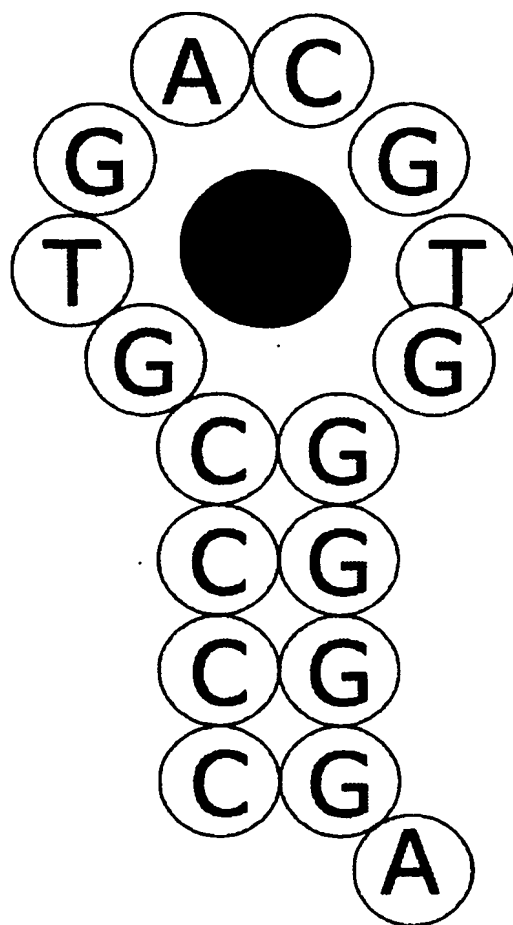
- 本発明の方法により取得されるアプタマーは種々の用途に利用することができる。
- 5 る。例えば、霞ヶ浦の汚染物質を測定する検査試薬としてアプタマーを活用したり、ウイルスタンパク質を阻害するアプタマーを開発することにより、治療薬として利用できる可能性がある。

- 14 -

請求の範囲

1. アプタマーの取得方法であって、以下の工程 (a) ~ (e) を含み、工程 (b) ~ (e) を任意の回数繰り返すことを特徴とする方法。
- 5 (a) 互いに異なる塩基配列からなる複数のポリヌクレオチドをマイクロアレイ用基板上へ固定する工程、
(b) 標識された標的分子とポリヌクレオチドが結合したマイクロアレイ用基板とを接触させる工程、
(c) 前記標的分子の前記ポリヌクレオチドとの結合強度を測定する工程、
10 (d) 結合強度の高いポリヌクレオチドを1つもしくは複数個選択する工程、
(e) 工程 (d) によって選択された各々のポリヌクレオチドの塩基配列において、変異が導入された塩基配列からなるポリヌクレオチドを、それぞれマイクロアレイ用基板上へ固定する工程、
2. 工程 (e) の変異が、1または2塩基の置換変異である、請求項1に記載の方法。
15
3. 標識が蛍光標識である、請求項1または2に記載の方法。
4. 標的分子を溶解した溶液にマイクロアレイ用基板を浸すことによって、工程 (b) の接触を行う、請求項1~3のいずれかに記載の方法。
5. 工程 (a) のポリヌクレオチドが、コンピュータによって作成されるランダムな配列であることを特徴とする、請求項1~4のいずれかに記載の方法。
20

図 1



2 / 4

図 2

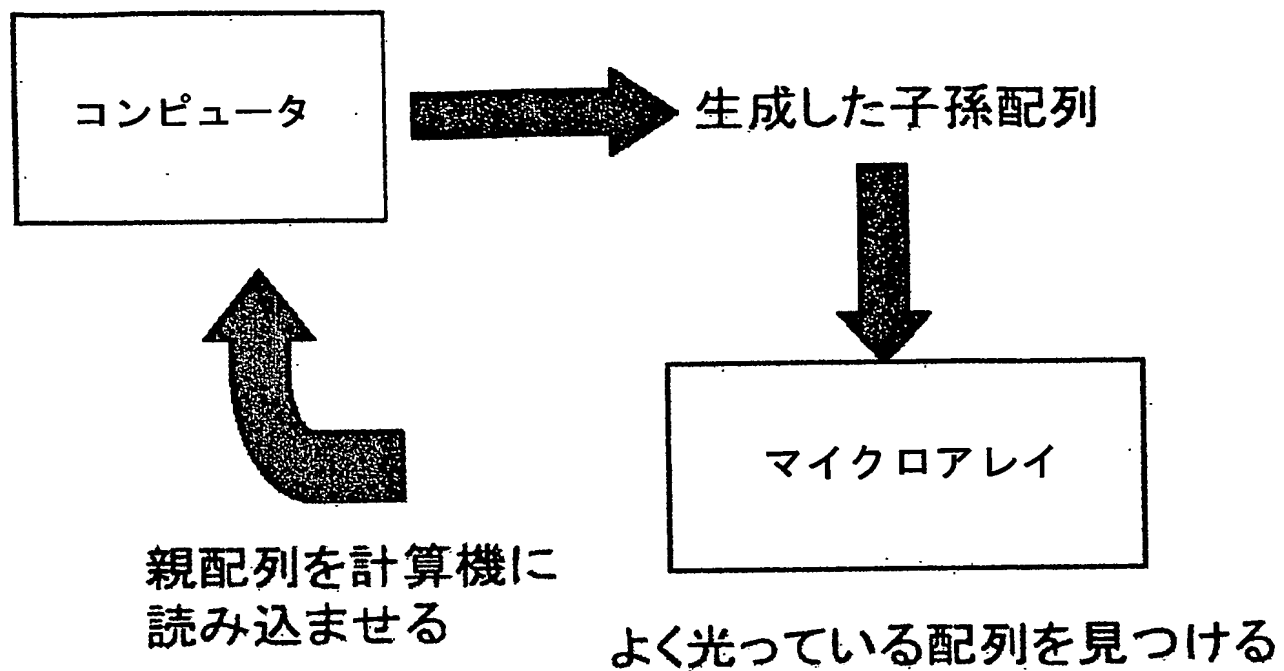
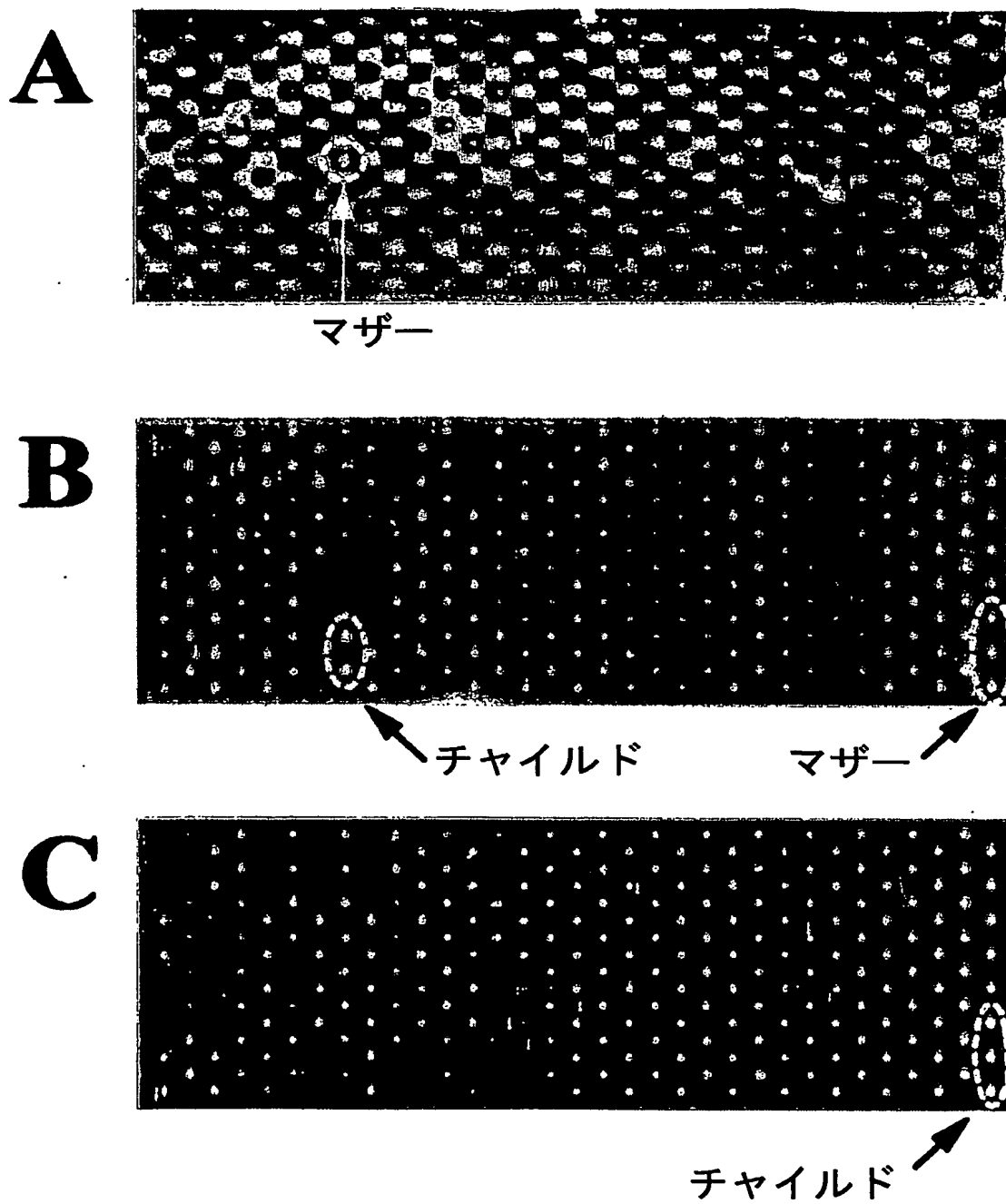
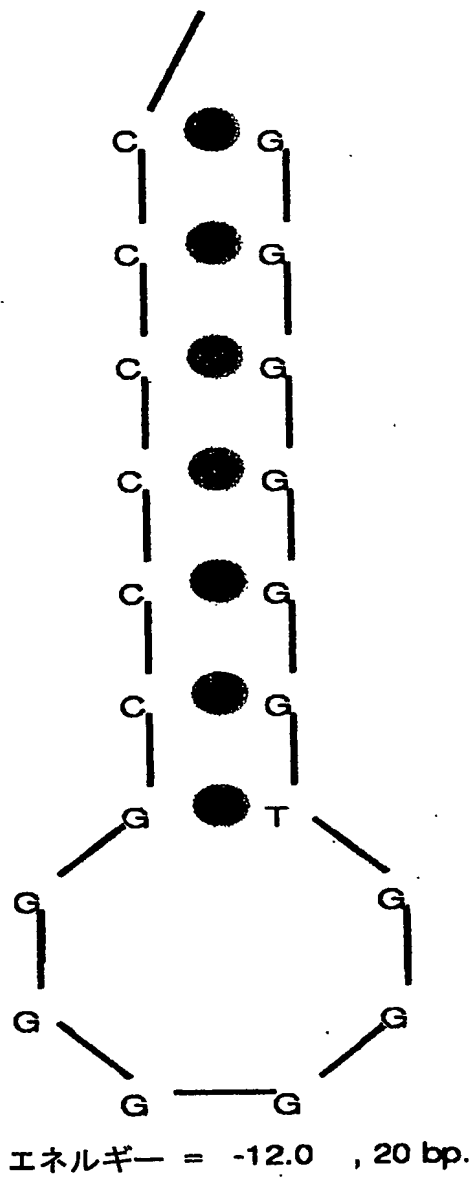


図 3



4 / 4

図 4



1 / 2

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Method for obtaining aptamer using a micro array device

<130> A3-A0305P

<140>

<141>

<150> JP 2003-089494

<151> 2003-03-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized aptamer sequence

2 / 2

<400> 1

ccccgtgacg tggggga

17

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized aptamer sequence

<400> 2

ccccccgggg gggtggggg

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/10, C12Q1/68, G01N33/543, G01N37/00, G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/10, C12Q1/68, G01N33/543, G01N37/00, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Asai R. et al.; In vitro selection of DNA aptamers on chips using a method for generating point mutations, February, 2004, Anal.Lett., Vol.37, No.4, pages 645 to 656	1-5
A	WO 01/57259 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION), 09 August, 2001 (09.08.01), & JP 2003-521695 A & CA 2400006 A & AU 3478301 A & US 2001/46674 A1 & EP 1252335 A1 & CN 1419606 T	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 June, 2004 (07.06.04)

Date of mailing of the international search report
22 June, 2004 (22.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004102

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/51663 A2 (MAXYGEN Inc.), 19 July, 2001 (19.07.01), & JP 2003-519495 A & CA 2396320 A & AU 2788101 A & US 2001/39014 A1 & EP 1276900 A1 & US 2003/54383 A1 & US 2003/54384 A1 & US 2003/64393 A1	1-5
A	JP 2002-508191 A (Soma Logic Inc.), 19 March, 2002 (19.03.02), & AU 1823199 A & WO 99/31275 A1 & CA 2312429 A & EP 1040203 A1 & US 6242246 B1 & AU 754956 B	1-5
A	JP 2003-508729 A (Brandeis University), 04 March, 2003 (04.03.03), & WO 00/70329 A1 & CA 2373314 A & AU 5012400 A & EP 1183521 A1	1-5
A	WO 01/69247 A2 (BIOINVENT INT. AB.), 20 September, 2001 (20.09.01), & GB 2360282 A & AU 200152160 A & US 2001/53520 A1 & EP 1263990 A2 & NO 200204413 A & JP 2003-527605 A & US 2004/67539 A1	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004102

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl¹ C12N15/10, C12Q1/68, G01N33/543, G01N37/00, G01N21/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl¹ C12N15/10, C12Q1/68, G01N33/543, G01N37/00, G01N21/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG); WPI (DIALOG); JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Asai R et al, In vitro selection of DNA aptamers on chips using a method for generating point mutations, Feb. 2004, Anal Lett., Vol. 37, No. 4, p. 645-656	1-5
A	WO 01/57259 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 2001.08.09 &JP 2003-521695 A &CA 2400006 A &AU 3478301 A &US 2001/46674 A1 &EP 1252335 A1 &CN 1419606 T	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
07.06.2004

国際調査報告の発送日
22.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
六笠 紀子
4 B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/51663 A2 (MAXYGEN Inc.) 2001. 07. 19 &JP 2003-519495 A &CA 2396320 A &AU 2788101 A &US 2001/39014 A1 &EP 1276900 A1 &US 2003/54383 A1 &US 2003/54384 A1&US 2003/64393 A1	1-5
A	JP 2002-508191 A (ソマロジック・インコーポレーテッド) 2002. 03. 19 &AU 1823199 A &WO 99/31275 A1 &CA 2312429 A &EP 1040203 A1 &US 6242246 B1 &AU 754956 B	1-5
A	JP 2003-508729 A (ブランディーズ・ユニバーシティ)2003. 03. 04 &WO 00/70329 A1 &CA 2373314 A &AU 5012400 A &EP 1183521 A1	1-5
A	WO 01/69247 A2 (BIOINVENT INT AB) 2001. 09. 20 &GB 2360282 A &AU 200152160 A &US 2001/53520 A1 &EP 1263990 A2 &NO 200204413 A &JP 2003-527605 A &US 2004/67539 A1	1-5

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：